

ساختار فیلوژنتیکی گونه *Trichoderma harzianum* جدا شده از برخی اقلیم‌های ایران

بهار کریمیان^۱، محمد جوان نیکخواه^{۲*}، دوستمراد ظفری^۳، خلیل بردی فتوحی^۴ فر^۴ و شهرام نعیمی^۵
۱، ۲، ۴. دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. دانشیار، گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بو علی سینا، همدان
۵. استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، آمل
(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۵ - تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۱۳)

چکیده

استرین‌های قارچ *Trichoderma harzianum* به دلیل کاربرد در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی و تأثیر بر زندگی بشر، اهمیت فراوانی دارند. در تحقیق حاضر، ساختار فیلوژنتیکی این گونه به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف و زیستگاه‌های متنوع در برخی اقلیم‌های ایران (NC، SCD و CSW) بررسی شد. به منظور بررسی و غربال اولیه، انگشت‌نگاری ۲۳۹ جدایه به دست آمده از جنس *Trichoderma* با استفاده از نشانگر RAPD-PCR انجام گرفت. براساس گروه‌بندی انجام گرفته، تعدادی جدایه از هر گروه به منظور تعیین توالی ناحیه ITS1-5.8 s- ITS2 از rDNA انتخاب شدند. در مجموع، ۱۷۶ جدایه از گونه *T. harzianum* به دست آمد. از این میان، ۷۶ جدایه که برای ناحیه ITS آنها تعیین توالی انجام گرفته بود، با روش ماکسیمم پارسیمونی تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شدند. در نتیجه، این جدایه‌ها در ۱۰ فیلوتیپ (phylo type) جای گرفتند. فیلوتیپ A با یک جدایه (4414) نماینده آلل جدیدی از ITS در گونه *T. harzianum* می‌باشد، که بومی ایران است. یافتن این آلل منحصر به فرد در اقلیم CSW در شمال ایران، می‌تواند بیانگر تأثیر این شرایط اقلیمی در ظهور این آلل جدید در گونه *T. harzianum* باشد.

واژه‌های کلیدی: آلل، فیلوژنی، فیلوتیپ، کنترل بیولوژیک، ITS.

مقدمه

از دیگر سوپستراهای مناسب این جنس می‌توان به خاک، بقایای گیاهی و چوب (Klein & Eveleigh, 1998) و همچنین اندام‌های گیاهی (Samuels, 2006) و پستانداران، از جمله اندام‌های بیمار انسان (Druzhinina et al., 2008) اشاره کرد. از قابلیت‌های مهم برخی گونه‌های این جنس، توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌هاست که آنها را قادر به حمله به سایر قارچ‌ها می‌سازد (Jaklitsch, 2009). این خصوصیت آنها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه بیمارگرهای گیاهی، از جمله قارچ‌ها (Druzhinina et al., 2011) و اخیراً نماتدها (Goswami et al., 2008) مطرح کرده است. با توجه به کاربردهای متنوع گونه‌های این جنس و تأثیرات آنها بر زندگی بشر، شناسایی صحیح گونه‌ها و

جنس *Hypocrea/Trichoderma* از قارچ‌هایی است که تأثیر وسیعی بر زندگی بشر دارند. استرین‌های این جنس به دلیل توانایی در برقراری انواع ارتباط هتروتروف با محیط اطراف، از جمله به صورت ساپروفیت، انگل و حتی اندوفیت‌های فرصت طلب، موجوداتی همه‌جازی (ubiquitous) بوده و قادر به رشد در بستر (سوبسترا)ها و اکوسیستم‌های متنوع هستند. یکی از سوپستراهای مناسب برای برخی گونه‌های این جنس، اندام‌های سایر قارچ‌هاست. این ارتباط می‌تواند به صورت انگلی روی سایر قارچ‌ها (mycoparasitism)، یا ساپروفیتی روی زیست توده (biomass) قارچی باشد، که از آن با عنوان mycotrophy یاد می‌شود (Druzhinina et al., 2011).

مطالعات انجام‌گرفته در مورد تنوع ژنتیکی و فیلوژنی گونه *T. harzianum* s. l. در سراسر دنیا حاکی از آن است که این گونه کمپلکس بوده، و قادر به زندگی در زیستگاه‌های متنوعی است (Chaverri et al., 2003; Migheli et al., 2009; Vahabi et al., 2009; Druzhinina et al., 2010; Blaszczyk et al., 2011; Naeimi et al., 2011; Chaverri & Samuels, 2013). در جامع‌ترین مطالعه انجام‌گرفته در مورد گونه کمپلکس *T. harzianum* (Druzhinina et al., 2010)، نتایج بررسی توالی‌های سه ناحیه ژنی مربوط به ۹۳ استرین از سراسر دنیا-از جمله یک جدایه از ایران- حاکی از وجود یک فرایند پیچیده گونه‌زایی درون این گروه بزرگ است، که مبتنی بر همزیستی و تعامل ارگانسیم‌هایی با راهبرد تکاملی متفاوت و در عین حال، نبود مرزهای دقیق ژنتیکی میان آنهاست. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد *H. lixii*-که به‌عنوان فرم جنسی (تلئومرف) قارچ *T. harzianum* مطرح شده است، تفاوت ژنتیکی فاحشی با آن دارد و کاربرد ترکیب *H. lixii/T. harzianum* به‌عنوان یک ارگانسیم واحد صحیح نیست، چراکه آنها دو گونه مجزا هستند. ایران کشوری پهناور با شرایط اقلیمی و زیست‌جغرافیایی متنوع در خاورمیانه است. بیشتر مطالعات انجام‌گرفته در ایران در مورد جنس *Trichoderma* بر قابلیت برخی گونه‌های این جنس در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی متمرکز بوده و مطالعات کمتری در زمینه تنوع زیستی استرین‌های آن، به‌خصوص با در نظر گرفتن شرایط اقلیمی و مناطق جغرافیایی متنوع و نیز سوبستراها و اکوسیستم‌های مختلف انجام گرفته است. هدف از این تحقیق، بررسی ساختار فیلوژنتیکی گونه *T. harzianum* s. l. به‌دست‌آمده از مناطق مختلف جغرافیایی در برخی اقلیم‌های ایران، و نیز سوبستراها و اکوسیستم‌های متنوع، براساس توالی نواحی Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2) بود. از آنجا که شناسایی دقیق و درک ساختار ژنتیکی عوامل کنترل بیولوژیک در کاربرد صحیح و مؤثر آنها در مزرعه نقشی اساسی دارد، نتیجه این تحقیق می‌تواند گامی در جهت استفاده صحیح از پتانسیل این عامل کنترل بیولوژیک در کشور باشد.

استرین‌های مختلف آن، اهمیت فراوانی دارد. اهمیت تاکسونومی صحیح این جنس با در نظر گرفتن این حقیقت آشکارتر می‌شود که نتایج متضاد حاصل از آزمایش‌های مشابه در مورد یک میکروارگانسیم یکسان ممکن است به‌دلیل شناسایی اشتباه آن میکروارگانسیم باشد (Jaklitsch, 2009). برای مثال، نام گونه *T. harzianum* در طول زمان‌های گذشته به گونه‌های بسیاری از این جنس نسبت داده شده است (Kullnig et al., 2001). چنین اشتباهاتی در نتیجه شناسایی گونه صرفاً براساس روش‌های مورفولوژیکی، و به‌عبارت دیگر، استفاده از مفهوم شناسایی مورفولوژیکی گونه (morphological species recognition یا MSR) رخ داده است؛ درحالی که این روش‌ها به‌دلیل محدود بودن و شباهت خصوصیات مورفولوژیکی مفید به‌منظور شناسایی گونه‌های *Trichoderma* قابل اعتماد نیستند (Druzhinina et al., 2005b). ورود روش‌های مولکولی به‌خصوص تعیین توالی نوکلئوتیدی DNA در قارچ‌شناسی تکاملی، به تغییرات شگرفی در تاکسونومی قارچ‌ها منجر شده است. مثال بارز در این زمینه جنس *Trichoderma* است، که استفاده از روش‌های مولکولی نه تنها ابزاری قوی برای شناسایی گونه‌های آن به‌شمار می‌رود، بلکه به روشن‌تر شدن وضعیت گونه‌های شناخته‌شده نیز کمک می‌کند. گونه *T. harzianum* یکی از شناخته‌شده‌ترین و فراوان‌ترین گونه‌های جنس *Trichoderma* (Migheli et al., 2009) است، که قادر به رشد در مکان‌های اکولوژیکی متنوعی است. این گونه از اجزای اصلی موجود در بسیاری از فرمولاسیون‌های تجاری قارچ‌کش‌ها (Druzhinina et al., 2010) و دارای کاربرد وسیع در کنترل بیولوژیک (بیوکنترل) عوامل بیماری‌زای گیاهی است. همچنین این گونه قادر به بهبود رشد و القای مقاومت در گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی است (Gromovich et al., 1998). نظر به اهمیت و تأثیر این گونه از جنس *Trichoderma* بر زندگی بشر، درک ساختار ژنتیکی و جایگاه صحیح رده‌بندی آن اهمیت زیادی دارد؛ اما با وجود اهمیت فراوان این گونه، به‌دلیل کمپلکس بودن (Chaverri et al., 2003)، حدود و ثغور آن به لحاظ تاکسونومیک و فیلوژنتیکی کاملاً شناخته‌شده نیست. نتایج حاصل از

1993) ساخته شده توسط شرکت Sigma Aldrich (Germany) به واکنش ۵۰ میکرولیتری شامل بافر PCR ۰/۵X (Promega, USA)، ۳ میلی مولار از MgCl₂ (Promega, USA)، ۰/۱۶ میلی مولار از dNTPs (Promega, USA)، یک واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (Promega, USA) و ۲۵ نانوگرم از DNA الگو افزوده شد. برنامه زمانی PCR نیز به ترتیب زیر بود: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، و در نهایت بسط پایانی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه. به منظور افزایش اعتبار نتایج به دست آمده، تمامی آزمایش های PCR دربرگیرنده کنترل های مثبت و منفی نیز بودند. محصولات PCR توسط الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) و بافر ۱X TAE مشاهده شدند.

شناسایی مولکولی گونه ها

پس از بررسی اولیه جدایه ها با استفاده از RAPD، از هر گروه یک یا تعداد بیشتری جدایه براساس الگوی باندها به دست آمده، به منظور تعیین توالی ناحیه ITS1-5.8 s- ITS2 انتخاب شدند. بدین منظور، ابتدا واکنش PCR برای تکثیر نواحی مذکور با استفاده از جفت آغازگر SR6R f و LR1 r (White et al., 1990) انجام گرفت. هر واکنش PCR شامل بافر PCR ۱X، ۳ میلی مولار از MgCl₂، ۰/۱۶ میلی مولار از dNTPs، ۰/۲۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای SR6R f (MWG-Biotech AG, Germany) و LR1 r (Sigma, USA)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲۵ نانوگرم از DNA الگوی بیشتر جدایه ها و ۱۳۰ نانوگرم از DNA الگوی تعداد اندکی از جدایه ها بود. تکثیر DNA براساس شرایط بیان شده توسط کولنیک گرادینگر و همکاران (Kullnig-Gradinger et al., 2002) انجام گرفت. واسرشت سازی اولیه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل

مواد و روش ها

نمونه برداری و آماده سازی اولیه جدایه ها

جمع آوری جدایه های قارچ طی سال های ۲۰۱۱-۲۰۱۰ از برخی اقلیم های ایران، شامل اقلیم سردسیری شمالی و ارتفاعات بالای ۱۵۰۰ متر (NC)، اقلیم نیمه سردسیری خشک فلات مرکزی (SCD) و اقلیم نیمه گرمسیری ساحلی و جلگه ای خاص داخلی (CSW) و از سوبستراهای و اکوسیستم های متنوعی انجام گرفت. سوبستراهای در نظر گرفته شده شامل خاک، قارچ بازیدیومیست *Armillaria sp.* (کلاهک و ریزومرف)، فیلوسفر و نیز چوب کنده های درختان بودند. تعدادی جدایه نیز از خاک، قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* و فیلوسفر و بقایای برنج، که طی سال های ۲۰۰۶-۲۰۰۹ جمع آوری شده بودند، از سایر محققان دریافت شدند. همچنین اکوسیستم های مختلفی چون مزارع، باغات و جنگل ها مورد بازدید و نمونه برداری قرار گرفتند. پس از جداسازی و خالص سازی جدایه های *Trichoderma* نگهداری آنها در ماسه بادی استریل و نیز گلیسرول ۵۰ درصد انجام گرفت. شناسایی مورفولوژیکی گونه ها نیز با استفاده از کلیدها و منابع شناسایی معتبر انجام پذیرفت (Bissett, 1991; Gams & Bissett, 1998; Gams & Meyer, 1998; Samuels et al., 2002; Jaklitsch, 2009).

RAPD-PCR به منظور بررسی و غربال اولیه جدایه ها

استخراج DNA قارچ براساس روش ترنر و همکاران (Turner et al., 1997) پس از اعمال تغییرات مختصری انجام گرفت. این دانشمندان بیان کردند که می توان از ضرایب تشابه صفات مورد استفاده در RAPD به عنوان معیاری برای نسبت دادن استرین ها به یک گونه بهره گرفت. بر این اساس، در تحقیق حاضر از RAPD به منظور غربال اولیه جدایه ها استفاده شد و جدایه های دارای الگوی باندهای خیلی مشابه تا یکسان که در یک گروه قرار گرفتند، به عنوان اعضای یک گونه در نظر گرفته شدند. بدین ترتیب، از هر گروه یک جدایه به منظور تعیین توالی ناحیه ITS انتخاب گردید. جهت تکثیر DNA ژنومی با استفاده از نشانگر RAPD، ۰.۲ میکرومولار از آغازگر M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'; Lieckfeldt et al.,

ناحیه *tefl* با استفاده از *TrichOBLAST* (<http://www.isth.info/tools/blast>; Kopchinskiy *et al.*, 2005) به انجام رسید.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

به منظور تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، ابتدا هم‌ردیف‌سازی (alignment) توالی‌های ITS به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار Clustal W (www.genome.jp/tools/clustalW/)، و ویرایش و بهینه‌سازی هم‌ردیف‌سازی اولیه با نرم‌افزار GeneDoc version 2.7.000 انجام گرفت. به دلیل شباهت بسیار زیاد توالی ناحیه 5.8 s جدایه‌های مورد استفاده در این تجزیه و تحلیل، این ناحیه، از هم‌ردیف‌سازی حذف شد. سپس، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از روش ماکسیمم پارسیمونی (Maximum Parsimony or MP) براساس توالی نواحی ITS1 و ITS2 مربوط به جدایه‌هایی که در نتیجه بودند، با استفاده از نرم‌افزار PAUP* (win-PAUP* 4.0b10) انجام پذیرفت. بدین منظور، از روش heuristic search و معیار parsimony optimality استفاده شد. الگوریتم تعویض شاخه، TBR (tree-bisection-reconnection) در نظر گرفته شد، که شامل افزودن تصادفی ۱۰۰ توالی در هر جست‌وجو بود. شکاف (gap)‌های موجود در هم‌ردیف‌سازی به عنوان داده از دست‌رفته (missing data) در نظر گرفته شدند. توالی نواحی ITS1 و ITS2 مربوط به یکی از جدایه‌های *T. virens* به عنوان outgroup در نظر گرفته شد. در نهایت، شجره حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش ماکسیمم پارسیمونی با استفاده از نرم‌افزار TreeView version 1.6.6 (win32) مشاهده شد، و تغییرات لازم با نرم‌افزار CorelDRAW Graphics Suite 13 در آن اعمال شد.

نتایج

تنوع گونه‌های *Trichoderma*

در مجموع، ۲۳۹ جدایه *Trichoderma* به دست آمد. فراوانی جدایه‌ها در هر یک از سه اقلیم مورد مطالعه در این تحقیق، از قرار زیر بود: ۷۷ جدایه -۳۲ درصد، ۶۰

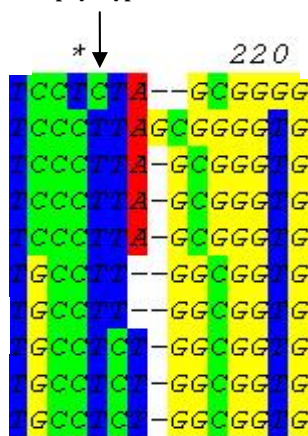
واسرشت‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و بسط رشته به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، و بسط پایانی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. تمامی آزمایش‌های PCR دربرگیرنده کنترل‌های مثبت و منفی بودند. قطعات تکثیر یافته DNA با استفاده از کیت خالص‌سازی mi-PCR Purification Kit (Metabion International AG, Germany) خالص‌سازی شده، و به منظور توالی‌یابی به شرکت Eurofins MWG, Operon (Ebersberg, Germany) فرستاده شدند. در موارد معدودی که شناسایی دقیق گونه براساس توالی نواحی ITS1 و ITS2 امکان‌پذیر نبود- شامل *T. longibrachiatum/H. orientalis* و سه جدایه متعلق به بخش *Trichoderma-harzianum* که به نظر می‌آمد گروه (فیلو تیپ) جدیدی را در این گونه تشکیل داده است، بخشی از ناحیه *tefl* translation elongation factor 1-alpha شامل اینترون‌های چهارم (بزرگ) و پنجم (کوچک) و نیز بخشی از اگزون ششم (بزرگ) با استفاده از جفت آغازگر EF1 و EF2 (Jaklitsch *et al.*, 2006; Komon-) و از توالی آن به عنوان ابزار تکمیلی شناسایی گونه استفاده شد. تکثیر ناحیه *tefl* تا حدود زیادی مشابه تکثیر ناحیه ITS و با به‌کارگیری شرایط زیر به انجام رسید: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، و در نهایت بسط پایانی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه. شناسایی مولکولی گونه‌ها براساس توالی نواحی ITS1 و ITS2 با استفاده از برنامه *TrichOKey* (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>; v. 2.0) و نیز از طریق جست‌وجوی تشابه با توالی‌های موجود در NCBI GenBank و TUCIM (TU Vienna-Collection of Industrial Microorganisms, Vienna University of Technology)، و در مورد توالی‌های

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

ماتریس داده‌ها شامل ۷۷ تاکسون-۷۶ توالی ITS1 و ITS2 مربوط به جدایه‌های متعلق به گونه *T. harzianum* و یک توالی متعلق به *T. virens* به‌عنوان outgroup- و ۳۹۷ صفت بود؛ که از این بین، ۳۷۳ صفت ثابت و ۲۴ صفت متغیر بودند. از بین صفات متغیر نیز ۱۰ عدد مفید (parsimony-informative) بودند. تمامی صفات از نوع نامنظم (unordered) و بدون وزن (unweighted) بودند. براساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، ۷۶ جدایه *T. harzianum* در ۱۰ فیلو تیپ قرار گرفتند (شکل ۲). فیلو تیپ C با ۱۹ جدایه بزرگ‌ترین گروه را تشکیل داد، و فیلو تیپ‌های H و F با ۱۶ و ۱۵ جدایه به ترتیب در مقام دوم و سوم جای گرفتند. یکی از دستاوردهای مهم این تحقیق، یافتن یک فیلو تیپ جدید در گونه *T. harzianum* است، که با نام فیلو تیپ A در شکل ۲ نمایش داده شده است. این فیلو تیپ، نماینده آلل منحصر به فردی از ITS در گونه *T. harzianum* است (شکل ۱)، که تا کنون در دنیا گزارش نشده و بومی ایران است. تنها جدایه تشکیل دهنده این فیلو تیپ (4414) از خاک یک مزرعه سیب زمینی در سرخن کلاته واقع در اقلیم CSW به دست آمده است. مشخصات جدایه‌های *T. harzianum* مورد استفاده در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی در جدول ۱ ملاحظه می‌شود.

جدایه ۲۵- درصد و ۱۰۲ جدایه ۴۳- درصد، که به ترتیب از اقلیم‌های NC، SCD و CSW به دست آمدند. تمامی جدایه‌ها به منظور انتخاب جدایه‌های نماینده برای شناسایی تاکسون‌ها، با استفاده از RAPD مورد بررسی اولیه قرار گرفتند. بدین ترتیب، ۱۶۹ جدایه در ۵۴ گروه قرار گرفتند؛ ۵۵ جدایه که الگوی بانندی منحصر به فردی داشتند، در گروه‌های تک‌عضوی جای گرفتند؛ و ۱۵ جدایه نیز فاقد الگوی بانندی مشخص بودند. ۱۷۶ جدایه که در مراحل بعد به‌عنوان *T. harzianum* شناسایی شدند، دارای الگوی بانندی بودند.

براساس نتایج حاصل از RAPD، ۱۴۹ جدایه به منظور توالی‌یابی ناحیه ITS انتخاب شدند. در میان گونه‌های شناسایی شده براساس ترکیبی از توالی نواحی ITS2 s-ITS1-5.8 و *T. harzianum atef1* فراوان‌ترین گونه است. سایر گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق عبارت بودند از *T. longibrachiatum*، *T. virens* (شامل یک جدایه شناسایی شده به‌عنوان *T. longibrachiatum*-*H. orientalis* نیز می‌شود)، *T. atroviride*، *T. pleuroticola*، *T. velutinum hamatum*، *T. citrinoviride*، *T. spirale asperelloides* و *T. koningii* long branch (به احتمال قوی *T. petersenii*). *T. asperelloides* و *T. petersenii* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند.

pyrimidine transition
in phylotype A

شکل ۱. موقعیت جانیشینی باز پیریمیدین (pyrimidine transition) در فیلو تیپ A، که نماینده آلل جدیدی از ITS در گونه *T. harzianum* است. حروف A تا J نشان‌دهنده یک نماینده از هر یک از ده فیلو تیپ به دست آمده هستند.

بحث

یافت‌شده در تحقیق حاضر (فیلوتیپ A)، آلل جدید و منحصر به فردی از ITS را در گونه *T. harzianum* معرفی می‌کند. این نتیجه با در نظر گرفتن نتایج حاصل از مطالعات مشابه، دستاورد مهمی است. برای مثال، در مطالعه *Migheli et al.*, (2009) در مورد تنوع زیستی ۴۸۲ جدایه *Hypocrea/Trichoderma* به‌دست‌آمده از جزیره ساردینیا در ایتالیا، با وجود پیش‌بینی این محققان مبنی بر وجود آلل‌های ITS1 و ITS2 بومی در این منطقه، تنها یک SNP (single nucleotide polymorphism) در توالی ITS1 متعلق به گونه *T. hamatum* یافت شد. هیچ‌یک از هفت هاپلوتیپ یافت‌شده در بین ۴۳ جدایه *T. harzianum* در تحقیق *Blaszczyk et al.*, (2011) نیز بومی لهستان نبودند. در چند مورد، ارتباطاتی میان فیلوتیپ‌های یافت‌شده.

در نتیجه تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با اقلیم، منشأ جغرافیایی، سوبسترا و اکوسیستم ملاحظه شد؛ تمامی سه جدایه به‌دست‌آمده از کلاردشت (واحد) واقع در اقلیم CSW که مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند، در فیلوتیپ C جای دارند. در این بین، دو جدایه مربوط به سوبسترا (خاک) و اکوسیستم یکسانی (مزرعه) نیز هستند. همچنین، تمامی پنج جدایه جمع‌آوری شده از رفسنجان و اطراف آن در اقلیم SCD که در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شرکت داشتند، از اعضای فیلوتیپ C هستند. از بین پنج جدایه به‌دست‌آمده از یزد و اطراف آن واقع در اقلیم SCD که مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند، سه جدایه به فیلوتیپ D و دو جدایه دیگر به فیلوتیپ H تعلق دارند. دو عدد از سه جدایه جای‌گرفته در فیلوتیپ D مربوط به مکان (بافق)، سوبسترا (خاک) و اکوسیستم (مزرعه) یکسانی هستند. جالب اینکه هر دو جدایه عضو فیلوتیپ H نیز از منشأ جغرافیایی (صدوق) یکسان و از خاک گلخانه به‌دست آمده‌اند. نمونه دیگر در این زمینه فیلوتیپ E است، که هر دو جدایه عضو آن از تهران در اقلیم NC و از قارچ *Agaricus bisporus* به‌دست آمده‌اند. فیلوتیپ G از چهار جدایه تشکیل شده است، که همگی از اقلیم CSW به‌دست آمده‌اند. در این بین، دو جدایه مربوط به مکان (خیرودکنار)، سوبسترا

در بین ۲۳۹ جدایه به‌دست‌آمده از اقلیم‌ها و زیستگاه‌های مختلف در ایران، بیشترین فراوانی متعلق به گونه *T. harzianum* است. چنین نتیجه‌ای در مطالعات سایر دانشمندان نیز به‌دست آمده بود (Zafari *et al.*, 2002; Migheli *et al.*, 2009; Blaszczyk *et al.*, 2011; Naeimi *et al.*, 2011; Khalili *et al.*, 2013). براساس نتایج حاصل از این تحقیق، سه گونه فرصت‌طلب و همه‌جازی *T. harzianum*، *T. virens* و *T. longibrachiatum* از تمامی اقلیم‌های مورد مطالعه به‌دست آمدند. همچنین، گونه *T. harzianum* از کلیه سوبستراها و اکوسیستم‌های مورد مطالعه جدا شد. از سوی دیگر، برخی گونه‌های شناسایی شده تنها از یک مکان، اقلیم، سوبسترا و اکوسیستم به‌دست آمدند. برای مثال، تمامی چهار جدایه متعلق به گونه *T. hamatum* از اقلیم CSW هستند. به‌علاوه، از این میان سه جدایه از مکان (بهشهر) و سوبسترا (خاک خزانه توتون) ی یکسانی جدا شده‌اند. نمونه دیگر در این زمینه گونه *T. velutinum* است، که تمامی سه جدایه آن از اقلیم (CSW)، منشأ جغرافیایی (کلاردشت، روستاهای متفاوت)، سوبسترا (خاک)، و اکوسیستم (مزرعه) یکسان به‌دست آمده‌اند. همچنین، دو جدایه شناسایی شده به‌عنوان *T. pleurotica* متعلق به اقلیم، مکان، سوبسترا و اکوسیستم یکسانی هستند، که به‌ترتیب عبارت از CSW، کلاردشت (روستای یکسان، ولی متفاوت با روستاهای مربوط به گونه *T. velutinum*)، خاک و باغ میوه هستند. از بین جدایه‌های انتخاب‌شده به‌عنوان نماینده به‌منظور تعیین توالی ناحیه ITS، ۷۶ جدایه متعلق به گونه *T. harzianum* تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شدند. بدین ترتیب، ۱۰ فیلوتیپ در میان ۷۶ جدایه یافت شد. این مقدار فراوان تنوع مؤید مطالعات مشابه است. در تحقیق *Blaszczyk et al.*, (2011) ۴۳ جدایه *T. harzianum* براساس توالی ناحیه ITS در هفت هاپلوتیپ جای گرفتند. *Naeimi et al.*, (2011) نیز در نتیجه تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌های ITS1 و ITS2 متعلق به ۱۱۶ جدایه *T. harzianum* ۱۴ ژنوتیپ یافتند. یکی از ۱۰ فیلوتیپ

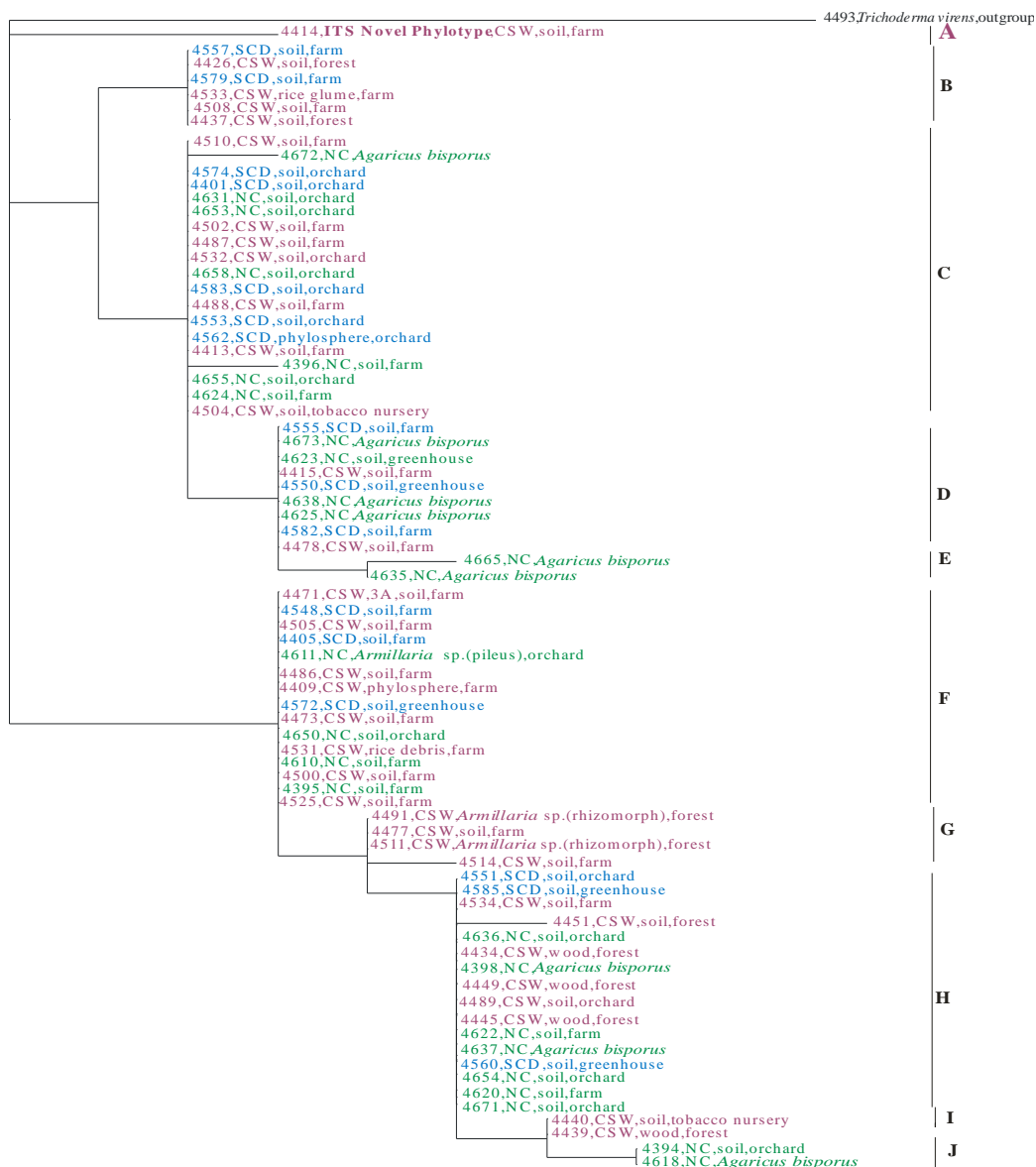
(ریزومرف قارچ *Armillaria* sp. و اکوسیستم (جنگل) یکسانی هستند.جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *T. harzianum* مورد استفاده در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

Isolate C.P.K. number	Location	Climate	Substrate	Ecosystem	ITS Phylotype
4414	Sorkhan Kalateh	CSW	Soil	Farm	A
4557	Varamin	SCD	Soil	Farm	B
4579	Varamin	SCD	Soil	Farm	B
4426	Golestan (Ziarat)	CSW	Soil	Forest	B
4437	Golestan (Hezar Pich)	CSW	Soil	Forest	B
4508	Kia Kola	CSW	Soil	Farm	B
4533	Chamestan	CSW	Glume	Farm	B
4396	Shahroud	NC	Soil	Farm	C
4624	Shahroud	NC	Soil	Farm	C
4631	Khomeyni Shahr	NC	Soil	Orchard	C
4653	Shahryar	NC	Soil	Orchard	C
4655	Shahryar	NC	Soil	Orchard	C
4658	Ghazvin	NC	Soil	Orchard	C
4672	Urmia	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	C
4401	Rafsanjan	SCD	Soil	Orchard	C
4553	Rafsanjan (Sirjan)	SCD	Soil	Orchard	C
4562	Rafsanjan	SCD	Phylosphere	Orchard	C
4574	Rafsanjan (Kashkouiye)	SCD	Soil	Orchard	C
4583	Rafsanjan	SCD	Soil	Orchard	C
4413	Glougah	CSW	Soil	Farm	C
4487	Jouybar	CSW	Soil	Farm	C
4488	Babol	CSW	Soil	Farm	C
4502	Kelardasht (Vahed)	CSW	Soil	Farm	C
4504	Sari	CSW	Soil	Tobacco nursery	C
4510	Kelardasht (Vahed)	CSW	Soil	Farm	C
4532	Kelardasht (Vahed)	CSW	Soil	Orchard	C
4623	Hashtgerd	NC	Soil	Greenhouse	D
4625	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	D
4638	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	D
4673	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	D
4550	Yazd	SCD	Soil	Greenhouse	D
4555	Yazd (Bafgh)	SCD	Soil	Farm	D
4582	Yazd (Bafgh)	SCD	Soil	Farm	D
4415	Gorgan	CSW	Soil	Farm	D
4478	Sari	CSW	Soil	Farm	D
4635	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	E
4665	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	E
4395	Khorasan Razavi	NC	Soil	Farm	F
4610	Shahryar	NC	Soil	Farm	F
4611	Khomeyni Shahr	NC	<i>Armillaria</i> sp. (pileus)	Orchard	F
4650	Shahryar	NC	Soil	Orchard	F
4405	Varamin	SCD	Soil	Farm	F
4548	Varamin	SCD	Soil	Farm	F
4572	Varamin	SCD	Soil	Greenhouse	F
4471	Golestan (Hashem Abad)	CSW	Soil	Farm	F
4473	Golestan (Nodijeh)	CSW	Soil	Farm	F
4409	Amol- Vosta Kola	CSW	Phylosphere	Farm	F
4486	Shast Kola	CSW	Soil	Farm	F
4500	Jouybar	CSW	Soil	Farm	F
4505	Sari- Airport	CSW	Soil	Farm	F
4525	Kelardasht	CSW	Soil	Farm	F
4531	Sari- Airport	CSW	Debris	Farm	F
4477	Kia Kola	CSW	Soil	Farm	G
4491	Kheyroud Kenar	CSW	<i>Armillaria</i> sp. (rhizomorph)	Forest	G
4511	Kheyroud Kenar	CSW	<i>Armillaria</i> sp. (rhizomorph)	Forest	G
4514	Kelardasht	CSW	Soil	Farm	G
4398	Tehran	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	H
4620	Shahryar	NC	Soil	Farm	H
4622	Shabestar	NC	Soil	Farm	H
4636	Shahryar	NC	Soil	Orchard	H
4637	Urmia	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	H
4654	Ghazvian	NC	Soil	Orchard	H
4671	Ramjin	NC	Soil	Orchard	H
4551	Kashan	SCD	Soil	Orchard	H
4560	Yazd (Sadough)	SCD	Soil	Greenhouse	H
4585	Yazd (Sadough)	SCD	Soil	Greenhouse	H
4434	Golestan (Hezar Pich)	CSW	Wood	Forest	H
4445	Golestan (Ziarat)	CSW	Wood	Forest	H
4449	Golestan (Nour-Alshohada)	CSW	Wood	Forest	H
4451	Golestan (Hezar Pich)	CSW	Soil	Forest	H
4489	Kelardsht	CSW	Soil	Orchard	H
4534	Shirgah	CSW	Soil	Farm	H
4439	Golestan (Hezar Pich)	CSW	Wood	Forest	I
4440	Gorgan- Jafar Abad	CSW	Soil	Tobacco nursery	I
4394	Sepidan	NC	Soil	Orchard	J
4618	Urmia	NC	<i>Agaricus bisporus</i>	-	J

* کد جدایه در مجموعه TUCIM

مشکل از دو جدایه است، که هر دو مربوط به اقلیم CSW هستند.

دیگر مورد شایان توجه آن است که از بین دو جدایهٔ مربوط به خیرودکنار که مورد آنالیز فیلوژنتیکی قرار گرفتند، هر دو متعلق به فیلوتیپ G هستند. فیلوتیپ I



0.1

شکل ۲. فیلوگرام ایجاد شده در نتیجهٔ آنالیز فیلوژنتیکی توالی نواحی ITS1 و ITS2 متعلق به ۷۶ جدایهٔ *T. harzianum* با استفاده از نرم‌افزار PAUP*. در هر یک از گره‌های انتهایی اطلاعات مربوط به کد جدایه، اقلیم، سوبسترا و اکوسیستم نمایش داده شده است. جدایه‌های به‌دست‌آمده از اقلیم‌های مختلف با رنگ‌های متفاوت نشان داده شده‌اند (اقلیم NC: سبز، اقلیم SCD: آبی و اقلیم CSW: صورتی). ده فیلوتیپ یافت‌شده (A-J) نیز ملاحظه می‌شوند. توالی نواحی ITS1 و ITS2 یکی از جدایه‌های *T. virens* به‌عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

در فیلوتیپ H جای دارند، که در مجاورت فیلوتیپ I است. دیگر مثال جالب توجه در این زمینه در فیلوتیپ B است؛ که از میان شش جدایهٔ عضو آن، دو جدایهٔ

یکی از این جدایه‌ها از چوب جدا شده است. در واقع، از بین چهار جدایهٔ به‌دست‌آمده از چوب که مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند، سه جدایهٔ دیگر

در این گونه در ایران می‌تواند گامی به سوی روشن‌تر شدن پیچیدگی این گونه در کشور باشد. از سوی دیگر، وجود این آلل در جدایه به‌دست‌آمده از اقلیم CSW در شمال ایران، می‌تواند نشان‌دهنده نقش مؤثر این شرایط اقلیمی در ظهور این آلل جدید در گونه *T. harzianum* باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در زمینه سایر خصوصیات این جدایه، اعم از صفات بیولوژیکی و متابولیکی و به‌ویژه پتانسیل آن در کنترل بیولوژیک انجام گیرند. امید بر آن است که یافتن برخی خصوصیات منحصر به فرد در این جدایه تا حدی به درک ساختار پیچیده این گونه در اقلیم CSW و در مقیاس وسیع‌تر، در ایران کمک کند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با استفاده از اعتبار پژوهشی طرح شماره ۷۱۱۰۰۲۲/۶/۲۳ اعطاشده توسط معاونت علمی دانشگاه تهران انجام گرفت. بخش مولکولی این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی وین، اتریش به انجام رسید. بدین وسیله، از کلیه محققانی که برخی از جدایه‌های *Trichoderma* را در اختیار ما قرار دادند، قدردانی می‌شود.

مربوط به اقلیم SCD (ورامین) و چهار جدایه متعلق به اقلیم CSW هستند. نکته جالب توجه آن است که از بین پنج جدایه به‌دست‌آمده از ورامین که مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند، سه جدایه دیگر در فیلوטיפ F و در مجاورت جدایه‌های مربوط به اقلیم CSW (در شمال ایران) جای دارند. این پدیده می‌تواند حاکی از انتقال جدایه‌ها از ورامین به شمال ایران باشد. به‌علاوه، این سه جدایه تنها جدایه‌های موجود در فیلوטיפ F هستند که به اقلیم SCD تعلق دارند. از سوی دیگر، برخی از جدایه‌های متعلق به مکان یا اقلیم یکسان از موقعیت فیلوژنتیکی متفاوتی برخوردار بودند. این امر می‌تواند بیانگر همزیستی دودمان‌های متنوع در کنار یکدیگر یا در وضعیت اقلیمی مشابه باشد. این نتایج مؤید دستاوردهای مطالعه Chaverri *et al.* (2003) است. این محققان وجود ارتباطات ضعیفی را بین هفت دودمان *T. harzianum/H. lixii* با منشأ جغرافیایی نشان دادند؛ و از سوی دیگر عنوان کردند که در برخی موارد جدایه‌های به‌دست‌آمده از منشأ جغرافیایی مشابه در موقعیت‌های فیلوژنتیکی متفاوتی قرار گرفتند. تحقیق حاضر با هدف بررسی ساختار فیلوژنتیکی گونه *T. harzianum* s. l. به‌دست‌آمده از دامنه وسیعی از مکان‌های اکولوژیکی و سویستراها در برخی اقلیم‌های ایران به انجام رسید. یافتن آلل منحصر به فردی از ITS

REFERENCES

1. Blaszczyk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G.J., Sobieralski, K. & Siwulski, M. (2011). Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics*, 52, 233-243.
2. Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69, 2373-2417.
3. Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G.J. & Geiser, D.M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27, 302-313.
4. Chaverri, P. & Samuels, G.J. (2013). Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of inter-kingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*, 67(10), 2823-2837.
5. Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska, M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. & Kubicek, C.P. (2008). Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 154, 3447-3459.
6. Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G. & Kubicek, C.P. (2005a). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 813-828.
7. Druzhinina, I.S. & Kubicek, C.P. (2005b). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(2), 100-112.

8. Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Belayneh Mulaw, T. & Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10(94).
9. Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev I.V. & Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 749-759.
10. Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In C.P. Kubicek & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. (pp. 3-34). Taylor and Francis Ltd.
11. Gams, W., & Meyer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia*, 90(5), 904-915.
12. Goswami, J., Pandey, R.K., Tewari, J.P. & Goswami, B.K. (2008). Management of root knot nematode in tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43(3), 237-240.
13. Gromovich, T.I., Gukasian, V.M., Golovanova, T.I. & Shmarlovskaya, S.V. (1998). *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a factor enhancing tomato plants' resistance to the root rotting pathogens. *Mikologiya I Fitopatologiya*, 32, 73-78.
14. Jaklitsch, W.M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, 63, 1-91.
15. Jaklitsch, W.M., Komon, M., Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. (2006). *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 98(3), 499-513.
16. Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, Sh. & Khosravi, V. (2013). Introduction of some *Trichoderma* species from rice fields of Mazandaran and Golestan provinces. In: Proceedings of the 1st Iranian Mycological Congress, 3-5 Sep., University of Guilan, Rasht, Iran, p. 55. (In Farsi)
17. Klein, D. & Eveleigh, D.E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. In C.P. Kubicek & G.E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. (pp. 57-74). Taylor and Francis Ltd.
18. Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7415-7426.
19. Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. (2005). *TrichOBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*, 109, 658-660.
20. Kullnig, C.M., Krupica, T., Woo, S.L., Mach, R.L., Rey, M., Benítez, T., Lorito, M. & Kubicek, C.P. (2001). Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 105(7), 769-772.
21. Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. & Kubicek, C.P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106(7), 757-767.
22. Lieckfeldt, E., Meyer, W. & Borner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33, 413-426.
23. Migheli, Q., Balmas, V., Komon-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11(1), 35-46.
24. Naeimi, S., Khodaparast, S.A., Javan-Nikkhah, M., Vagvolgyi, C. & Kredics, L. (2011). Species pattern and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Research Communications*, 39(4), 560-568.
25. Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
26. Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. & Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94(1), 146-170.
27. Turner, D., Kovacs, W., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Peter, B., Arisan-Atac, I., Strauss, J., Samuels, G. J., Borner, T. & Kubicek, C.P. (1997). Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycological Research*, 101(4), 449-459.

28. Vahabi, K., Sharifnabi, B. & Zafari, D. (2009). Genetic diversity of *Trichoderma* spp. associated with button mushroom, *Agaricus bisporus*, inferred from AFLP markers and ITS sequencing. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 44(2), 239-253.
29. White T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (pp. 315-322). Academic Press.
30. Zafari, D., Ershad, D., Zare, R. & Alizadeh, A. (2002). A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 38, 21-45. (In Farsi).